



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 9/127, C12N 9/96, A61K 38/48</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/27907</b> <b>(43) Date de publication internationale: 10 juin 1999 (10.06.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/02579 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 1er décembre 1998 (01.12.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/15073 1er décembre 1997 (01.12.97) FR 98/03807 27 mars 1998 (27.03.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CAP-SULIS [FR/FR]; Château Bersol, 218-228, avenue du Haut-Levêque, F-33600 Pessac (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> DEGERT, Corinne [FR/FR]; 49, rue Claude Debussy, F-33160 Saint Médard en Jalles (FR). LAVERSANNE, René [FR/FR]; 62, avenue du Parc d'Espagne, F-33600 Pessac (FR). ROUX, Didier [FR/FR]; 6 bis, rue Langevin, F-33700 Mérignac (FR). UGAZIO, Stéphane [FR/FR]; 2, passage Fronsac, F-33000 Bordeaux (FR). <b>(74) Mandataires:</b> PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, MX, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title: IMPROVED METHOD FOR AVOIDING THE DEGRADATION OF AN ACTIVE PRINCIPLE</b> <b>(54) Titre: PROCEDE PERFECTIONNE POUR EVITER LA DEGRADATION D'UN PRINCIPE ACTIF</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns an improved method for avoiding the degradation of an active principle. The invention is characterised in that the active principle is incorporated inside multilamellar vesicles with an onion-like structure and consisting, from the periphery towards the centre, concentric membranes in the form of double layers comprising at least a surfactant, said membranes being separated by an interstitial liquid, said vesicles containing at least an agent for avoiding degradation of said active principle. The invention is more particularly applicable to the stabilisation of products sensitive to oxidation, reduction or hydrolysis and to products sensitive to more specific degradation reactions such as enzymes. The invention also concerns compositions containing said multilamellar vesicles and their method of preparation.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne un procédé perfectionné pour éviter la dégradation d'un principe actif. Selon ce procédé, le principe actif se trouve incorporé au sein de vésicules multilamellaires présentant une structure en oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes concentriques sous forme de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules contenant au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif. L'invention s'applique tout particulièrement à la stabilisation de produits sensibles à l'oxydation, à la réduction ou à l'hydrolyse ainsi qu'à des produits sensibles à des réactions plus spécifiques de dégradation, tels que les enzymes. L'invention concerne également des compositions contenant ces vésicules multilamellaires ainsi que leur procédé de préparation.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Procédé perfectionné pour éviter la dégradation d'un principe actif

La présente invention concerne un procédé perfectionné pour éviter la dégradation d'un principe actif.

5           Que ce soit en cosmétique, en pharmacie, en détergence ou encore en agroalimentaire, la fonctionnalité d'un produit est généralement due à la présence d'une molécule dite matière active ou agent actif. A titre d'exemple, on peut citer les vitamines, utilisées en agro-alimentaire et en pharmacie, les enzymes utilisées en détergence, les organo-phosphorés utilisés comme insecticides, ou encore les  
10 arômes et parfums utilisés dans l'hygiène, l'agro-alimentaire ou la cosmétique.

L'une des caractéristiques essentielles d'un produit industriel ou pharmaceutique, outre son activité et son efficacité, est sa stabilité, de manière à obtenir un produit ayant une durée de vie suffisante. Malheureusement, de nombreuses matières actives sont des molécules particulièrement fragiles, dont la  
15 dégradation sous l'effet des contraintes d'environnement est trop rapide pour obtenir la durée de vie souhaitée du produit la contenant. C'est le cas de certaines vitamines comme les vitamines C, A ou E, de beaucoup d'enzymes comme par exemple les protéases, et plus généralement de beaucoup de protéines et de molécules biologiques, ou encore dans le domaine des insecticides, du malathion  
20 et des pyréthrinoïdes, et, d'une manière plus générale, des molécules réductrices ou oxydantes.

De nombreuses stratégies ont été élaborées pour éviter la dégradation de ces molécules actives fragiles. Ces stratégies dépendent de la nature de la réaction provoquant la dégradation. Les réactions les plus souvent incriminées  
25 sont soit l'hydrolyse soit l'oxydo-réduction. D'autres réactions plus spécifiques ont aussi lieu, comme l'autoprotéolyse dans le cas des protéases.

Dans le cas où l'eau est une cause directe ou indirecte de la dégradation, une solution simple consiste à éviter le contact de la molécule active avec un milieu aqueux. C'est le cas par exemple d'insecticides dissous dans un  
30 solvant organique, et mis en œuvre en aérosol. Malheureusement cette possibilité n'existe pas toujours, comme par exemple pour la cosmétique ou l'agro-alimentaire, qui, pour des raisons évidentes, ne peuvent utiliser les solvants organiques. De plus, la tendance actuelle, pour des raisons écologiques et de santé publique, est à la suppression de l'utilisation de solvants organiques dans toutes les  
35 branches de l'industrie.

Lorsque l'eau n'est qu'une cause indirecte, par exemple par effet d'oxydation par l'oxygène dissous, on peut travailler avec une eau dégazée. D'une manière plus générale, on peut travailler en atmosphère inerte, à la fois pour la fabrication et la conservation du produit final. Cette solution est souvent employée

5 en agro-alimentaire, où les produits liquides enrichis en vitamines sont conditionnés soit sous vide d'air, soit sous atmosphère inerte. Malheureusement cette méthode ne permet de limiter la dégradation que jusqu'à l'ouverture du contenant. Elle n'est donc pas applicable dans le cas de produits nécessitant une longue durée de vie après ouverture.

10 Les enzymes sont des protéines qui catalysent de manière très spécifique des réactions chimiques. Elles sont très utilisées industriellement, par exemple dans les lessives pour dégrader les protéines (protéases), les lipides (lipases) ou les résidus amylacés (amylases), facilitant ainsi le nettoyage. Ces protéines sont en général instables en solution, et sont donc surtout utilisées dans

15 les lessives en poudre. Leur utilisation en lessive liquide (pour le linge ou la vaisselle) est très limitée par leur instabilité à long terme.

De même, une tendance actuelle est à l'utilisation d'enzymes en cosmétique, par exemple des protéases pour aider à la desquamation de la peau, et donc à son renouvellement. Là encore l'instabilité des enzymes empêche leur

20 utilisation simple.

L'immobilisation d'enzymes est un sujet très développé, au moins en recherche, les applications industrielles n'étant pas encore très nombreuses. Les travaux sur l'encapsulation d'enzymes font partie de ceux du domaine de la bioencapsulation qui comprend aussi l'encapsulation d'organismes "vivants"

25 (levures, bactéries...). En général il est fait appel à des polymères qui forment une matrice immobilisant l'enzyme.

Dans ces travaux, il s'agit généralement d'immobiliser l'enzyme (ou la levure) pour l'avoir sous forme facilement manipulable, comme par exemple des microbilles que l'on peut extraire du milieu de réaction, après usage, par simple

30 filtration ou tamisage suivant leur taille. Par conséquent la forme encapsulée de l'enzyme doit garder son activité. Le matériau d'encapsulation doit être suffisamment poreux pour laisser diffuser le substrat et les produits de réaction. Une revue de ces développements peut être trouvée dans "Bioencapsulation in biotechnology, Biomat., Art. Cells & Immob. Biotech., 21, 291-297 (1993)".

Les principales réactions conduisant à la perte d'activité d'une enzyme sont la dégradation chimique, la perte de configuration spatiale ou l'aggrégation de plusieurs enzymes. Les méthodes typiquement utilisées pour éviter ou limiter les excès de ces dégradations sont la modification chimique de la molécule et  
5 l'immobilisation.

La protection d'enzymes vis à vis de leur dénaturation par encapsulation est moins courante. En effet, les matrices polymères utilisées dans l'immobilisation laissant diffuser les substrats, elles sont trop poreuses pour réellement protéger l'enzyme. Les principales réactions de dégradation sont celles  
10 touchant les protéines. Il s'agit, en particulier, d'hydrolyses spécifiques des liaisons entre acides aminés et de réactions conduisant à une dénaturation par changement de conformation n'impliquant pas de liaisons covalentes, mais entraînant une perte d'activité de l'enzyme, par modification de l'accessibilité du site catalyseur par exemple. Ainsi dans l'article "Prolonged retention of cross-linked trypsin in  
15 calcium alginate microspheres, J. Microencapsulation, 14, 51-61 (1997)", il est montré qu'il est nécessaire de réticuler préalablement l'enzyme par du glutaraldéhyde pour assurer sa protection, ce qui induit une perte de 50 % de son activité.

Dans le cas des enzymes, par exemple dans les lessives liquides ou  
20 dans les crèmes cosmétiques, il n'est pas possible d'utiliser un solvant non aqueux, à la fois pour des raisons de sécurité et de coût. L'introduction d'enzymes dans ce type de produit se heurte donc à des difficultés réelles. Une solution, parfois adoptée en cosmétique consiste à utiliser un emballage sophistiqué, constitué de deux réservoirs indépendants, l'un contenant la molécule active, l'autre contenant  
25 le reste de la préparation. Le mélange est effectué extemporanément au moment de l'utilisation du produit, grâce à un système de double pompe doseuse sur le flacon. Cette solution est assez onéreuse, et peu commode d'utilisation. Cette solution a aussi été mise en œuvre dans le cas de la cosmétique pour proposer des produits de beauté contenant des vitamines.

Une autre méthode consiste aussi à séparer l'actif de son milieu, mais  
30 de manière microscopique en le microencapsulant dans des microsphères de polymère, ou en l'enrobant, par exemple par une technique d'enrobage en lit fluidisé, dans une matrice polymère. Cette technique peut s'avérer intéressante, en particulier pour des produits destinés à être incorporés dans des formes sèches.  
35 Elle présente l'inconvénient de nécessiter la rupture de la coque ou de l'enrobage

polymère pour libérer l'actif. Elle est donc peu adaptée à des produits cosmétiques où la libération de l'actif doit se faire spontanément au moment de l'application du produit, ou à des produits alimentaires, qui doivent libérer leur actif en bouche.

Lorsque l'instabilité de la matière active est modérée, l'utilisation de  
5 molécules protectrices peut s'avérer intéressante. C'est le cas des agents anti-  
oxydants largement utilisés dans les crèmes cosmétiques et les produits  
alimentaires. Ils sont en général simplement additionnés à la préparation, mais du  
fait de la dilution il est nécessaire d'en ajouter une quantité plus importante que  
nécessaire pour obtenir un effet. D'autre part, comme beaucoup d'additifs, leur  
10 usage tend à être de plus en plus réglementé, et les doses autorisées diminuées.

Il est connu d'encapsuler des principes actifs dans des vésicules à base  
de tensioactifs.

Ces vésicules présentent généralement une ou plusieurs bicouches. On  
parlera de vésicules unilamellaires lorsqu'elles sont constituées d'un coeur aqueux  
15 entouré d'une bicouche de tensioactifs et de vésicules paucilamellaires ou  
multilamellaires lorsqu'elles présentent plusieurs bicouches. Parmi les vésicules  
multilamellaires, on distingue celles que l'on désignera ci-après par "vésicules  
multilamellaires ou MLV de type classique" et des vésicules de structure bien  
particulière que l'on désignera ci-après par "vésicules multilamellaires à structure  
20 en oignon". Ces deux types de vésicules multilamellaires se distinguent par trois  
différences fondamentales :

1°. Leur procédé d'obtention

Le procédé d'obtention des MLV classiques fait généralement appel à  
un mélange préliminaire en milieu solvant organique des lipides et autres  
25 composants constituant l'enveloppe desdites MLV, puis à l'évaporation du solvant  
pour obtenir un film sec. Les vésicules sont ensuite obtenues par réhydratation de  
ce film de lipides par une solution aqueuse contenant l'agent actif à encapsuler.

Les vésicules multilamellaires à structure en oignon sont, quant à  
elles, obtenues par cisaillement d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant  
30 l'actif à encapsuler.

2°. Leur structure

Du fait de leur mode de préparation, les MLV classiques sont des  
agrégats de feuillets multilamellaires de type lipidique rassemblés au sein d'une  
membrane lipidique approximativement sphérique. Cette structure apparaît très  
35 clairement dans le cliché donné dans le brevet US 4,975,282.

Les liposomes sont le plus souvent obtenus à partir des MLV classiques décrits ci-dessus, après application d'un très fort cisaillement (par ultrasons ou presse de French), les transformant en vésicules unilamellaires ou paucilamellaires caractérisées par la présence d'un coeur aqueux.

- 5 Les vésicules multilamellaires à structure en oignon se présentent, quant à elles, sous forme d'un empilement régulier de bicouches concentriques allant du coeur même des vésicules jusqu'à leur périphérie.

3°. Leur nature thermodynamique

- 10 A l'intérieur des vésicules multilamellaires classiques, le nombre de feuillets multilamellaires, leur nombre de couches, le nombre de repliements et leur arrangement sont des caractéristiques qui dépendent du mode de préparation et en particulier de phénomènes cinétiques intervenant lors de la réhydratation du film lipidique. La structure interne des vésicules n'est pas uniforme au sein d'une vésicule (zones de faible courbure, zones de forte courbure, zones  
15 multilamellaires, zones continues). Une telle structure n'est donc pas à l'équilibre thermodynamique. De plus, chaque vésicule a une constitution différente, et il n'y a donc pas uniformité de structure sur tout l'échantillon.

- Il a été décrit, en particulier dans la demande WO 96/31194 des liposomes de type classique paucilamellaire constitués de quelques couches  
20 entourant un coeur aqueux, au sein desquels se trouvent associés une molécule et son stabilisant.

- Des compositions dans lesquelles un agent actif se trouve encapsulé au sein de vésicules multilamellaires à structure en oignon, constituées, de leur centre jusqu'à leur périphérie, d'une succession de couches lamellaires séparées par un  
25 milieu liquide se trouvent déjà décrites dans différents brevets référencés ci-dessous. Ces vésicules peuvent être obtenues par un procédé comprenant la préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide et sa transformation par application d'un cisaillement. Un tel procédé est en particulier décrit dans le brevet WO 93/19735 issu du brevet français FR 2 689 418 ou WO 95/18601 introduits  
30 ici par référence.

- Selon le brevet français FR 2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la pâte cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules encore appelées micro-capsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en  
35 particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la

transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

Différentes applications de ce type de vésicules ont été décrites par la demanderesse. On citera, en particulier, la demande internationale WO 95/19707  
5 qui décrit des compositions odorantes dans lesquelles un produit odorant se trouve incorporé au sein de telles vésicules multilamellaires, l'effet d'une telle encapsulation étant d'augmenter la rémanence de l'odeur, du fait du ralentissement de l'évaporation. On citera également la demande française FR 2 735 658 qui  
10 décrit des compositions à usage alimentaire dans lesquelles un produit ou un additif à usage alimentaire se trouve inclus au sein de telles vésicules multilamellaires, avec pour effet essentiel d'obtenir un relargage contrôlé particulièrement avantageux du produit encapsulé, la présence de la vésicule multilamellaire permettant en outre de protéger, avant leur introduction dans les compositions, les molécules souvent fragiles qui se trouvent incorporées en son  
15 sein.

Toutefois, une telle composition, même si elle apporte dans certains cas un effet déjà sensible sur la stabilisation des molécules fragiles, peut s'avérer insuffisante pour des molécules particulièrement sensibles ou dont on cherche à obtenir une stabilisation particulièrement accrue à l'égard d'un environnement a  
20 priori défavorable.

Ainsi les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert que l'action de protection de molécules fragiles déjà observée dans le cas particulier de certains produits du domaine alimentaire, pouvait être considérablement accrue par incorporation au sein des vésicules multilamellaires à  
25 structure en oignon d'un agent destiné à stabiliser ces molécules fragiles. Une telle présentation du couple produit actif/agent stabilisant permet d'obtenir une stabilisation accrue, donc une durée de vie des produits incorporant l'agent actif accrue avec des concentrations nettement plus faibles en agent stabilisant, ce qui est un avantage considérable de la présente invention.

30 Cette invention s'avère particulièrement intéressante dans tous les domaines où l'on cherche à protéger un agent actif vis-à-vis d'une action de dégradation. Elle s'applique à tous les produits connus pour leur fragilité et, tout particulièrement, aux vitamines et aux enzymes.

En ce qui concerne les enzymes, l'invention fournit un moyen  
35 particulièrement efficace permettant d'assurer à la fois la fonction



d'immobilisation d'une enzyme et sa protection vis-à-vis du milieu extérieur en vue d'améliorer sa stabilité.

Ainsi, la présente invention offre une solution particulièrement économique et efficace aux problèmes liés à la stabilisation de matières actives fragiles avec, en outre, tous les avantages liés à la technique d'encapsulation utilisée :

- grande souplesse de formulation,
- grande variété des tensioactifs utilisables,
- capacité de mettre en oeuvre simultanément plusieurs actifs,
- possibilité de recourir à plusieurs agents, en vue d'augmenter encore la stabilisation,
- stabilité accrue en milieu aqueux, aussi bien simple que complexe (gel, détergent, émulsion).

Ainsi, selon l'une de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne des compositions contenant un agent actif encapsulé au sein de vésicules multilamellaires présentant une structure en oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes concentriques sous forme de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules contenant au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif.

Par structure en "oignon", on entend, comme exposé précédemment, une structure multilamellaire, dans laquelle les vésicules de forme sensiblement sphérique sont constituées d'une succession de bicouches concentriques et, cela, du centre à la périphérie des vésicules, d'où le nom de structure en oignon utilisé par analogie, pour qualifier de telles structures.

Ces structures peuvent être mises en évidence par examen microscopique des compositions. L'observation se fait en utilisant un microscope optique en lumière polarisée, dans lequel une phase lamellaire, biréfringente est visible. Elle se manifeste par une texture caractéristique, liée à la présence des défauts (joints de grains) entre les domaines de phase orientés différemment. Dans le cas de la phase concentrée de vésicules, la texture est caractérisée par son caractère uniforme et fin, relié à la taille des vésicules. Dans la phase dispersée de vésicules, celles-ci sont visibles sous la forme de points plus ou moins résolus (en fonction de la taille), légèrement biréfringents. La biréfringence ne s'observe que lorsque la dispersion n'est pas trop diluée. Il y aura donc lieu, si la dispersion est

relativement diluée de procéder à une opération préalable de concentration pour mettre clairement en évidence la biréfringence caractéristique de la présence des vésicules à structure en oignon.

Le principe de l'invention consiste à utiliser les vésicules comme des micro-récipients contenant la molécule à protéger, et empêchant la réaction de dégradation de se produire. Pour cela, le rôle de la vésicule est double : d'une part isoler la molécule active de son environnement, et d'autre part apporter les additifs nécessaires à la stabilisation, ce qui s'avère particulièrement intéressant pour les molécules sensibles. L'un des avantages majeurs de la vésicule est de confiner la molécule fragile et sa protection dans un petit volume, beaucoup plus faible que le volume total de la préparation, et donc d'éviter ainsi l'effet de dilution, permettant de ce fait l'utilisation d'une plus faible quantité de molécule protectrice.

Selon une variante avantageuse, le liquide interstitiel est de l'eau et l'agent actif est inclus dans les membranes des vésicules lorsqu'il est hydrophobe ou dans le liquide interstitiel lorsqu'il est hydrophile.

Selon une autre variante avantageuse de l'invention, les vésicules ont des dimensions comprises entre 0,1 et 50  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 0,2 et 10  $\mu\text{m}$ .

De telles structures sont avantageusement obtenues par incorporation de l'agent actif et de l'agent destiné à le stabiliser dans une phase lamellaire cristalline comprenant au moins un agent tensioactif puis transformation, par application d'un cisaillement, de cette phase cristal-liquide lamellaire en une phase dense de vésicules multilamellaires de petite taille.

Ce cisaillement pourra être un cisaillement homogène, ce qui présente l'avantage de conduire à des vésicules de taille parfaitement homogène. Toutefois, une simple agitation mécanique pourra s'avérer suffisante pour conduire à la formation des vésicules multilamellaires de l'invention.

Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules ou microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

Comme cela ressort en particulier des exemples illustratifs de l'invention, le choix des agents tensioactifs utilisables pour former les membranes

des vésicules multilamellaires de l'invention est très large. Toutefois, on choisira ces agents tensioactifs en fonction du domaine d'utilisation de la composition visée. Dans de nombreux cas, l'application envisagée comporte des contraintes qui limitent le choix des tensioactifs. Il s'agit souvent de contraintes législatives ou  
5 liées à des normes. Ainsi, dans le domaine de la cosmétique, le catalogue de l'INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) fournit la liste des produits autorisés, dans le cas de l'agro-alimentaire on se réfère à la liste positive des additifs autorisés, ou dans celui de la pharmacie, à la pharmacopée.

La formulation fait avantageusement intervenir un mélange de  
10 molécules tensioactives. Il est généralement utilisé au moins deux tensioactifs différents ayant des balances hydrophile-lipophile différentes, ce qui permet de régler en continu les propriétés des bicouches et ainsi de contrôler l'apparition de l'instabilité qui gouverne la formation des vésicules multilamellaires.

Selon une variante particulièrement avantageuse de l'invention, on  
15 utilisera un mélange de deux agents tensioactifs dits respectivement agent tensioactif lipophile, présentant une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 3 et 7, et agent tensioactif hydrophile, présentant une HLB comprise entre 8 et 15.

Selon une autre variante avantageuse de l'invention, les membranes  
20 des vésicules contiennent au moins un agent tensioactif polymère ou un polymère présentant des propriétés amphiphiles.

C'est le cas par exemple des poloxamères, et autres dérivés copolymères de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène éventuellement modifiés par adjonction de chaînes hydrophobes.

On peut citer à titre d'exemples non exhaustifs la famille des Pluronic®  
25 et Lutrol® (BASF), les hydroxystéarate de polyéthylène (Solutol® de BASF ou MYRJ® de ICI).

L'invention s'applique de façon particulièrement avantageuse à tout type d'agent actif connu pour sa fragilité. Il s'agit en particulier d'agents sensibles à  
30 l'oxydation ou à la réduction, à l'hydrolyse ou à des réactions plus spécifiques telles que l'autoprotéolyse dans le cas des protéases.

A titre d'agents actifs fragiles auxquels s'adresse tout particulièrement la présente invention, on citera les molécules réductrices, oxydantes, sensibles à l'hydrolyse, en particulier les vitamines, les enzymes, les protéines, les molécules  
35 biologiques d'une façon générale.

Un domaine où elle trouve des applications également très intéressantes est celui des insecticides. En effet, les insecticides se classent en plusieurs grandes familles parmi lesquelles on peut citer les organophosphorés, les organochlorés et les pyréthrénoïdes. La tendance actuelle est d'utiliser des molécules suffisamment biodégradables pour être rapidement détruites dans l'environnement. Les organochlorés par exemple sont quasiment tous interdits à cause de leur trop grande persistance dans l'environnement. Se pose alors le problème de la stabilité dans le temps des molécules utilisées. C'est le problème posé par certains organophosphorés qui sont assez rapidement hydrolysés ou les pyréthrénoïdes (dérivés synthétiques du pyrèthre, extrait d'un chrysanthème) qui sont instables. Le procédé de l'invention s'avère particulièrement intéressant pour stabiliser tous ces produits particulièrement instables. C'est le cas en particulier des pyréthrénoïdes.

Un autre domaine où l'invention trouve des applications particulièrement intéressantes est celui de la cosmétique et de la dermatologie où de nombreux actifs sont connus pour leur fragilité. C'est le cas en particulier des vitamines A, E et C, par exemple, et également des molécules comme la DHA (dihydroxyacétone, agent autobronzant), des oligomères procyanidoliques, des enzymes.

Un autre domaine où l'invention trouve une application particulièrement intéressante est celui des médicaments pour lesquels les notions de fragilité de la molécule, et de limitation des additifs autorisés sont encore plus pertinentes que dans la cosmétique.

Un autre exemple où l'invention trouve des applications intéressantes est celui de la stabilisation de l'hydroquinone et de ses dérivés qui sont des produits très utilisés dans le domaine de la photographie en tant que développeur mais aussi en cosmétique et qui souffrent tout particulièrement de la sensibilité à l'oxydation du fait de leur propriétés réductrices.

L'agent destiné à stabiliser l'agent actif sera choisi en fonction de la nature de cet agent actif et du type de dégradation que l'on cherche à éviter et, cela, en tenant compte en outre du type d'application visée.

Ainsi, le(s) additif(s) nécessaire(s) à la stabilisation peut (peuvent) être un (des) composé(s) spécifiquement conçu(s) pour apporter la protection de l'actif. C'est le cas où l'agent actif est un produit sensible à l'oxydation et l'agent destiné à éviter sa dégradation, un agent connu comme agent anti-oxydant.

C'est le cas également lorsque le produit actif voit sa stabilité modifiée par une variation de pH susceptible, par exemple, de provoquer une réaction d'hydrolyse ou encore de modifier le potentiel redox du produit actif. On choisira alors d'encapsuler un agent stabilisateur permettant de modifier localement le pH,  
5 de façon à accroître la stabilité du produit actif.

Lorsque l'on souhaite améliorer la stabilité d'un produit actif sensible à l'oxydation, la vésicule contient avantageusement un produit connu pour ses propriétés anti-oxydantes du fait de ses propriétés réductrices ou du fait de son action pour diminuer le risque d'oxydation par effet séquestrant, par exemple par  
10 effet séquestrant des traces d'ions métalliques catalyseurs de l'oxydation contenus dans le milieu, ou par action sur le pH du milieu lorsque le potentiel redox dépend du pH.

Ainsi, on citera de façon non exhaustive à titre d'agents anti-oxydants :  
l'acide ascorbique et ses dérivés,  
15 l'acide citrique et ses dérivés (aussi utilisés comme séquestrant),  
l'acide glutamique, les glutamates et leurs dérivés,  
l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (séquestrant),  
l'acide lactique et ses dérivés (aussi utilisés pour ajuster le pH),  
l'acide tartrique et ses dérivés (aussi utilisés pour ajuster le pH et comme agent  
20 séquestrant),  
la benzophénone,  
les bioflavonoïdes,  
le butylhydroxy hydroxyanisol,  
le butylhydroxy hydroxytoluène,  
25 le carotène et ses dérivés,  
le chlorobutanol,  
les gallates de propyle, d'octyle ou de dodécyle,  
le sulfite de sodium ou de potassium, et les composés apparentés tels que le bisulfite ou le pyrosulfite,  
30 les tocophérols (alpha, delta ou gamma) et leurs dérivés,  
d'une manière générale tous les additifs alimentaires des classes E3xx et E22x de la classification européenne des additifs alimentaires.

A titre d'exemple, la vitamine C et ses dérivés sont bien connus pour  
35 leur sensibilité à l'oxydation. On a clairement mis en évidence qu'on pouvait

améliorer leur stabilité en les co-encapsulant avec un agent anti-oxydant.

A titre d'agent anti-oxydant, on pourra utiliser du bisulfite de sodium et/ou un agent séquestrant permettant d'éliminer les traces de métaux oxydants, par exemple l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).

- 5           A titre d'exemple d'agent permettant d'éviter l'hydrolyse par effet de modification locale du pH, on citera le tartrate de sodium qui pourra être co-encapsulé avec de l'ascorbylphosphate de magnésium (APG) en vue d'augmenter sa stabilité par modification locale du pH.

- 10           L'agent destiné à stabiliser le produit actif peut également faire partie de la membrane de la vésicule, s'il a des propriétés amphiphiles. C'est le cas de la vitamine E ou de ses dérivés qui peuvent être co-encapsulés avec un actif sensible à l'oxydation, afin de jouer le rôle d'anti-oxydant donc protecteur. Mais la vitamine E (acétate de tocophérol) est un produit amphiphile de par sa nature moléculaire. On pourra donc tirer avantage de cette propriété pour adapter la formulation de la
- 15           phase cristal-liquide. Ainsi, la vitamine E est incorporée dans la membrane de tensioactif et joue un rôle actif dans la formulation de cette membrane permettant de conférer à la phase cristal-liquide les caractéristiques adéquates pour obtenir les vésicules par cisaillement.

- 20           Il existe également d'autres cas où l'agent stabilisant jouera également le rôle d'agent tensioactif participant à la formulation des membranes des vésicules. De tels exemples seront donnés plus loin à propos de la stabilisation des enzymes.

- 25           Selon une autre variante de l'invention, on pourra choisir comme agent destiné à stabiliser ledit agent actif un agent qui, en lui-même, constitue un second agent actif de la composition. C'est le cas par exemple de la vitamine E qui, du fait de ses propriétés anti-radicalaires, constitue dans une composition cosmétique où elle est associée avec de la vitamine A ou de la vitamine C, non seulement un agent destiné à stabiliser cette vitamine A comme indiqué précédemment, mais également un second agent actif de ladite composition.

- 30           Dans le cas particulier où la molécule à stabiliser est une enzyme, on utilisera comme agent stabilisant, d'une façon générale, soit un additif connu pour stabiliser ou protéger les protéines, désigné ci-après par additif protecteur non

- 35           spécifique des enzymes, soit un agent spécifique destiné à stabiliser spécifiquement une enzyme.

Ainsi, dans le cas des protéases, un inhibiteur de protéases permettra d'éviter l'autoprotéolyse.

Selon une première variante, où l'on utilise un additif protecteur non spécifique, celui-ci est choisi avantageusement parmi les produits qui sont connus  
5 pour agir sur la conformation de l'enzyme. A titre d'exemple de tels produits, on citera en particulier des ions dont l'effet est d'augmenter la force ionique et de se fixer sur certains sites chargés de l'enzyme ou des molécules susceptibles d'engager des liaisons faibles avec la protéine.

L'homme du métier comprendra aisément que les ions les plus  
10 efficaces sont les ions relativement gros, par exemple des ions ammoniums et ammoniums quaternaires en ce qui concerne les cations et des sulfates, phosphates, carboxylates et polyacides carboxyliques en ce qui concerne les anions. L'homme du métier comprendra aisément que son choix pour obtenir la meilleure efficacité devra se porter sur des ions suffisamment gros ou attachés à  
15 une molécule suffisamment grosse.

Parmi les ions particulièrement intéressants pour stabiliser les enzymes, on citera l'ion calcium bien connu pour intervenir spécifiquement dans la réactivité de beaucoup d'enzymes, en particulier des protéases.

Dans la variante selon laquelle on utilise des molécules spécifiques  
20 stabilisatrices, on choisit avantageusement des molécules portant des fonctions susceptibles de se lier à l'enzyme, par exemple des molécules qui ont la possibilité de former des liaisons hydrogènes avec l'enzyme. Parmi ces molécules, on citera en particulier les alcools et les polyols, avantageusement des polyols associés à un dérivé du bore, en particulier à un ion borate, des amines éthoxylées et des oxydes  
25 d'amines. On pourra également choisir de recourir à des tensioactifs comportant plusieurs oxydes d'éthylène. De tels tensioactifs entreront dans la formulation des membranes des vésicules de l'invention et participeront à la stabilisation des enzymes.

Ainsi donc, on pourra citer à titre d'agents destinés à stabiliser des  
30 enzymes incorporées au sein de ces vésicules, des tensioactifs et des molécules amphiphiles contenant les fonctions suivantes ou substitués par les groupes suivants :

- ammoniums quaternaires,
- amines et éthanolamine,
- 35 • molécules portant une fonction phosphate, en particulier phospholipides,

- sels et esters d'acides gras,
- sels de polyacides,
- alcools,
- glycérol et ses esters (les glycérides),
- 5 • polyols (polyglycérides, polyéthylèneglycol, polypropylèneglycol),
- sucres (sorbitol, glucose, lactose, saccharose...).

Les agents stabilisants des enzymes seront avantageusement choisis parmi les dérivés polymères qui contiennent des fonctions d'un des types précédents, en particulier :

- 10       ◇ les polysaccharides modifiés ou non tels que :
  - \* agarose,
  - \* gommes guar,
  - \* carraghénanes,
  - \* acide alginique et alginate,
  - 15       \* pectine,
  - \* chitosan,
- ◇ les polyvinylpyrrolidones, éventuellement substituées,
- ◇ les celluloses et dérivés de celluloses (alkylés ou fonctionnalisés),
- ◇ les polyacrylates,
- 20       ◇ les polyvinylalcools (PVA) et les dérivés partiellement hydrolysés des polyvinylacétates,
- ◇ les polyacrylamides,
- ◇ les polyamides.

Les essais réalisés par les inventeurs de la présente invention montrent  
25 que la présence dans les vésicules multilamellaires incorporant une enzyme, en tant qu'agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme, soit d'un tensioactif ou d'une molécule amphiphile présentant au moins une fonction azotée, soit d'un polymère présentant également une fonction azotée, permet d'améliorer considérablement la stabilisation de l'enzyme.

30 Lorsqu'on recourt comme agent de stabilisation d'une enzyme à un agent tensioactif comportant au moins une fonction azotée, on choisit de préférence un agent tensioactif, dans lequel la fonction azotée fait partie de la tête polaire dudit agent tensioactif.

Selon cette variante où les fonctions azotées font partie de la tête  
35 polaire du tensioactif, la queue hydrophobe est avantageusement constituée d'une



ou plusieurs chaînes carbonées. On peut donc définir indépendamment la nature de la partie hydrophobe qui ne varie pas beaucoup d'un tensioactif à l'autre : au moins une (deux en général) chaîne alkyle de 1 à 22 carbones, linéaire ou ramifiée, simple ou substituée, éventuellement portant un résidu cyclique ou  
5 aromatique, saturée ou portant une ou plusieurs insaturations, éventuellement substituée par d'autres fonctions. La ou les chaînes formant la partie hydrophobe de l'agent tensioactif peuvent être soit directement liées à l'atome d'azote de la fonction azotée, soit, le cas échéant, liées à l'un des substituants de l'azote.

Lorsqu'on recourt, pour stabiliser une enzyme, à l'utilisation d'un  
10 polymère portant au moins une fonction azotée, on le choisit avantageusement dans la liste suivante :

- polyacrylamides et produits de polymérisation ou de copolymérisation des dérivés de l'acrylamide,
- dérivés amidés de polysaccharides en particulier gommés guar  
15 quaternisés telles que le chlorure de guar hydroxypropyltrimonium.
- dérivés de la chitine tels que chitosan, sels de poly D-glucosamine, les contre-ions de ces polymères pouvant contenir une fonction amine ou dérivée (glutamate, par exemple),
- polyamides.

20 Dans le cas spécifique où l'on cherche à stabiliser une enzyme en évitant son autolyse, on co-encapsule avantageusement un inhibiteur de protéase, par exemple l'EDTA, le phénylméthanesulfonylfluorure, la 3,4-dichloroisocoumarine, la chymostatine.

Afin de renforcer le rôle de confinement joué par la vésicule, il peut  
25 être avantageux d'ajouter dans sa formulation un ou des polymères ou molécules à haut point de fusion, qui vont renforcer l'étanchéité de la vésicule. Ce renforcement de l'étanchéité peut aussi être obtenu par tout moyen permettant de diminuer l'échange avec le milieu de dispersion final, en particulier en enrobant la vésicule avec un polymère ou une cire, éventuellement une cire autoémulsifiable.

30 Ainsi, l'invention couvre également selon une variante avantageuse des compositions dans lesquelles les vésicules comprennent en outre au moins un agent destiné à renforcer leur étanchéité, cet agent étant encapsulé au sein des vésicules ou constituant un enrobage externe de ces mêmes vésicules.

Selon une variante particulièrement avantageuse de l'invention, on  
35 pourra choisir comme agent destiné à stabiliser le produit actif un agent qui

simultanément améliore l'étanchéité de la vésicule. Ainsi, pour stabiliser la vitamine C, on la co-encapsulera avec de la pectine qui, en se liant à la vitamine C, la stabilise et qui simultanément améliore l'étanchéité de la vésicule.

En résumé l'invention consiste à utiliser la microvésicule  
5 multilamellaire comme un milieu de confinement d'une molécule fragile et des additifs permettant sa stabilisation, éventuellement en renforçant son étanchéité.

Selon un autre de ses aspects, l'invention couvre également le procédé de préparation d'une composition telle que définie précédemment comprenant les étapes de :

10 - préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif et incorporant au moins un agent actif et un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif,

- transformation de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon, par cisaillement.

15 Ce cisaillement sera avantageusement un cisaillement homogène tel qu'enseigné dans le brevet FR 2 689 418.

La transformation de la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon pourra être facilitée en jouant sur le choix tensioactifs. On pourra, en particulier, choisir comme indiqué précédemment un  
20 tensioactif présentant une haute HLB et un agent tensioactif présentant une basse HLB.

Par ailleurs, certains tensioactifs sont particulièrement adaptés pour favoriser cette transformation. Ainsi, c'est le cas par exemple des poloxamères, et autres dérivés copolymères de l'oxyde d'éthylène et de l'oxyde de propylène  
25 éventuellement modifiés par adjonction de chaînes hydrophobes. Ces composés sont particulièrement intéressants car ils apportent à la fois l'adaptation des propriétés élastiques de la membrane de tensioactifs et sa stabilisation par effet stérique. On peut citer à titre d'exemples non exhaustifs la famille des Pluronic® et Lutrol® (BASF), les hydroxystéararate de polyéthylène (Solutol® de BASF ou  
30 MYRJ® de ICI).

Enfin selon un dernier aspect, l'invention concerne également un procédé pour améliorer la stabilité d'un produit actif et éviter sa dégradation, caractérisé en ce qu'il consiste à encapsuler ledit produit actif au sein de vésicules multilamellaires telles que définies précédemment, présentant une structure en  
35 oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes sous

forme de bicouches concentriques comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranés étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit produit actif.

5 Pour les raisons exposées précédemment l'invention trouve une application particulièrement intéressante dans la stabilisation et/ou l'immobilisation des enzymes.

Ainsi, l'invention porte tout particulièrement sur un procédé pour protéger et/ou immobiliser une enzyme selon lequel on encapsule ladite enzyme  
10 au sein des vésicules multilamellaires à structure en oignon telles que définies précédemment, lesdites vésicules contenant en leur sein au moins un agent tel que défini précédemment destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme.

Les excellents résultats obtenus en ce qui concerne la stabilisation d'une l'enzyme, lorsque celle-ci se trouve incorporée au sein d'une vésicule multilamellaire comprenant au moins un agent stabilisant choisi parmi les  
15 tensioactifs, les molécules amphiphiles et les polymères, portant au moins une fonction susceptible de se lier à ladite enzyme, ont semblé clairement liés à l'existence d'une liaison par laquelle l'enzyme se trouve en quelque sorte complexée à l'un des constituants des membranes de la vésicule. Ces résultats ont  
20 suggéré qu'une interaction du même type pourrait se produire entre la surface d'une vésicule multilamellaire incorporant dans ses membranes un tel agent stabilisant. Cette hypothèse a pu être confirmée par le fait qu'on a pu également constater un net effet de stabilisation d'une enzyme lorsque celle-ci se trouve mise en contact au sein d'une composition avec des vésicules multilamellaires à  
25 structure en oignon dont la formulation est telle que leurs membranes comprennent au moins un produit stabilisant choisi parmi les molécules amphiphiles, les tensioactifs et les polymères, portant au moins une fonction susceptible de se lier à ladite enzyme.

Ainsi donc, selon un autre aspect de la présente invention, elle  
30 concerne également un procédé pour protéger et/ou immobiliser une enzyme selon lequel on met ladite enzyme en présence de vésicules multilamellaires à structure en oignon, c'est-à-dire de vésicules constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes sous forme de bicouches concentriques comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide  
35 interstitiel, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un composé dit

agent stabilisant, portant au moins une fonction susceptible de se lier à ladite enzyme. Cet agent stabilisant est choisi parmi les molécules amphiphiles, les tensioactifs et les polymères cités précédemment comme agent ayant un effet stabilisant sur une enzyme encapsulée.

5 Les exemples qui suivent donnés à titre purement illustratif de l'invention montrent comment il a été possible selon l'invention d'améliorer la stabilité de différents actifs réputés fragiles.

Ces exemples font également référence aux figures 1 à 4 :

- la figure 1, donnée en référence à l'exemple 1, donne les variations  
10 de la concentration en vitamine C non dégradée en fonction du temps pour une composition où la vitamine C est encapsulée, en comparaison avec une composition où elle est libre ;

- la figure 2, donnée en référence à l'exemple 3, illustre la stabilisation  
15 de l'ascorbylphosphate de magnésium (APG) par co-encapsulation avec un agent modifiant son pH ;

- la figure 3, donnée en référence à l'exemple 5, illustre la stabilisation  
de la trypsine par encapsulation dans des vésicules multilamellaires à structure en oignon contenant, à titre d'agent stabilisant, un agent tensioactif portant une fonction ammonium ;

20 - la figure 4, donnée en référence à l'exemple 6, illustre la stabilisation de la trypsine par encapsulation dans une vésicule multilamellaire à structure en oignon incorporant un tensioactif de la famille des esterquats.

### EXEMPLES

25 Dans les exemples qui suivent, sauf indications contraires, les proportions sont données en pourcentages en poids.

#### Exemple 1

##### Vitamine C

30 La vitamine C est très sensible à l'oxydation. La stabilisation a pu être obtenue par encapsulation dans des microvésicules multilamellaires, renforcées par un polymère naturel réticulé (pectine) et co-encapsulation d'additifs permettant la stabilisation : séquestrant éliminant les traces d'ions métalliques catalyseurs de l'oxydation (EDTA), anti-oxydant (bisulfite de sodium) en procédant comme  
35 indiqué ci-dessous :

## a) Formulation :

Composants A	%
Polysorbate 60	24
oléate de sorbitan	20
Acétate de vitamine E	5
Conservateur	1
Composants B	%
Eau	37,5
Acide éthylène diamine tétra acétique	0,08
bisulfite de sodium	0,82
pectine	1,6
Acide ascorbique	10

## b) Mode opératoire :

5 Les ingrédients B sont mélangés 30 min à température ambiante sous agitation dans l'ordre de la liste. On obtient un gel translucide.

Les ingrédients A sont mélangés à température ambiante sous agitation, puis le mélange B est ajouté en maintenant l'agitation et la température ambiante. L'agitation est maintenue 2 h.

10 On obtient une pâte épaisse, qu'il faut disperser à 50% dans une solution de chlorure de calcium, destinée à réticuler la pectine. Pour cela une solution aqueuse contenant 20 g/l de  $\text{CaCl}_2$  est additionnée lentement à la pâte maintenue sous agitation. On obtient une dispersion fluide laiteuse, dont l'observation au microscope montre la présence de vésicules biréfringentes.

15

## c) Dosage

La dispersion de vésicules est rediluée dans l'eau pour atteindre une teneur en vitamine C de 5%. Cette dispersion est placée en étuve à 45°C pour suivre la stabilité. La teneur en vitamine C dans l'échantillon est mesurée par un dosage à l'iode.

20

Le résultat de la stabilisation est illustré par la courbe de la figure 1 donnant le taux de vitamine C en fonction du temps à 45°C pour la dispersion de vésicules (notée "encapsulée" sur la figure 1) dont la préparation est décrite ci-

dessus, en comparaison avec les résultats obtenus pour une simple dispersion de vitamine C à même concentration initiale dans l'eau (notée "libre" sur la figure).

On remarque que, alors que la solution de vitamine C se dégrade continuellement, la vitamine C encapsulée reste à 80% de sa quantité initiale pendant plus de 45 jours à 45°C.

### Exemple 2

#### Vitamine A et vitamine E

##### a) Formulation :

	Composant	%
A	Palmitate de saccharose	40
B	Linoléate de glycérol	9
C	Palmitate de Vitamine A	15
D	Acétate de vitamine E	1
E	Eau	34
F	Conservateur	1

##### b) Mode opératoire

B, C, D et F sont mélangés à température ambiante pendant 10 min. On additionne ensuite délicatement A en maintenant l'agitation. Lorsque A est complètement incorporé, on additionne E puis la température est augmentée à 65°C et maintenue pendant 1 h. La température est ensuite baissée à 40 °C en maintenant l'agitation, sur un intervalle de temps de 2 h.

On obtient une pâte homogène biréfringente montrant en observation au microscope une texture fine et régulière caractéristique.

##### c) Résultats

Le suivi par HPLC a clairement permis de mettre en évidence l'amélioration de la stabilité de la vitamine A du fait de son encapsulation dans des vésicules contenant, en outre, de la vitamine E.

### Exemple 3

Ascorbyl phosphate de magnésium (APG)

Ce composé est un dérivé de la vitamine C, plus stable que l'acide ascorbique, mais cependant peu stable en dessous de pH = 7,5. Cela pose un problème en cosmétique car le pH de la peau est de 5,5, et il est préférable que le produit cosmétique ait un pH voisin de celui de la peau.

Dans ce cas, l'encapsulation est effectuée dans des microvésicules de tensioactifs non-ioniques. L'APG est préalablement dissous dans un milieu tartrate de sodium, co-encapsulé dans les vésicules, apportant la stabilisation, en procédant comme indiqué ci-dessous. La courbe de dégradation à 45°C, de l'APG libre et encapsulé, à pH= 5,5 est donnée sur la figure 2 qui donne le pourcentage d'APG non dégradé en fonction du temps.

## a) Formulation :

Composant	%
Polysorbate 60	12
Stéarate de sorbitan	34
Acétate de tocophérol	4
Solution A	49
Conservateurs	1

## Solution A :

Acide tartrique : 2.88%  
APG : 28%  
Eau : 69.12%

## b) Mode opératoire :

La solution A est préparée préalablement par dissolution de l'acide tartrique dans l'eau, ajustement du pH à 7,3-7,5 par addition de soude 6N, et introduction lente sous agitation à température ambiante de l'APG en poudre.

Les tensioactifs, la vitamine E et le conservateur sont mélangés sous agitation à 70°C. Lorsque le mélange est fondu et homogène, la solution A est ajoutée lentement sous agitation à cette température. Lorsque l'incorporation est

complète, le chauffage est arrêté, et la température abaissée jusqu'à l'ambiante,

sous agitation, pendant 1 h.

c) Stabilité :

La stabilité du produit est suivie par dosage à l'iode de la vitamine C dans une dispersion aqueuse à 3% d'APG, soit libre, soit encapsulé dans les vésicules multilamellaires. Les résultats sont donnés sur la figure 2.

On constate que la dégradation de l'APG encapsulé est plus de 10 fois plus lente que celle de l'APG libre à ce pH (par la mesure du temps de demi dégradation).

Exemple 4

Hydroquinone et ses dérivés

L'hydroquinone et ses dérivés sont couramment utilisés en photographie comme développeur, mais aussi en cosmétique comme agent éclaircissant de la peau. Ce sont des molécules fortement réductrices, qui s'oxydent donc facilement à l'air ou en milieu aqueux.

De la méthylhydroquinone a été encapsulée dans des vésicules de tensioactifs non ioniques encapsulant du bisulfite de sodium comme anti-oxydant.

a) Formulation

Vésicules

Composant	%
Polysorbate 60	10
Stéarate de sorbitan	40
Glycérol	34
Méthyl hydroquinone	16

Dispersion

Composant	%
Pâte de vésicules	50,0
Bisulfite de sodium	0,05
Conservateur	0,8
Eau permutée	49,15

b) Mode opératoire



Toutes les opérations (préparation, transfert et dispersion) sont effectuées sous atmosphère d'argon.

La méthyl-hydroquinone est préalablement dissoute dans le glycérol, à raison de 32 % de méthyl-hydroquinone pour 68 % de glycérol par mélange à 90°C pendant 30 min

Dans un émulsionneur muni d'une agitation mécanique avec une pale râcleuse, on mélange les deux tensioactifs et on chauffe à 70°C. Lorsque les tensioactifs sont fondus, on additionne la solution de méthyl-hydroquinone dans le glycérol et on maintient le mélange 30 min à cette température. Le chauffage est ensuite arrêté pour laisser la température revenir à l'ambiante sous agitation. On obtient une pâte homogène blanche, dont l'observation en microscopie optique en lumière polarisée montre la texture biréfringente caractéristique de la présence de microvésicules.

La dispersion est effectuée par addition lente dans un erlenmeyer muni d'une pale d'agitation mécanique de la solution de dispersion (eau dégazée et bisulfite de sodium) sur la pâte précédente, à température ambiante sous agitation continue. Le conservateur est additionné en une seule fois à la fin de l'addition de solution aqueuse. L'agitation est maintenue environ 2 h pour obtenir une dispersion complète. L'observation au microscope optique montre une dispersion de vésicules légèrement biréfringentes.

#### c) Résultats

Le produit encapsulé ne montre qu'une légère coloration rose alors qu'une solution de méthylhydroquinone noircit rapidement.

#### Exemple 5

#### Stabilisation d'une enzyme par encapsulation dans une vésicule contenant un tensioactif portant une fonction ammonium

##### 1) Principe du test de mise en évidence de la stabilisation des enzymes

Pour démontrer l'effet de stabilisation des enzymes, on mesure l'activité d'une enzyme encapsulée, en fonction du temps de vieillissement, par comparaison avec l'enzyme simplement mise en solution dans les mêmes conditions de vieillissement. L'enzyme encapsulée étant inaccessible, il faut préalablement la libérer pour pouvoir mesurer son activité. L'expérience comporte

donc quatre étapes :

\* préparation des échantillons

5       \* encapsulation de l'enzyme et dispersion des vésicules contenant  
l'enzyme

          \* mise en solution à la même concentration de l'enzyme témoin

\* mise en vieillissement de la dispersion de vésicules et de la solution témoin

\* libération de l'enzyme des vésicules

10       \* mesure de l'activité enzymatique de l'échantillon testé et de l'échantillon témoin.

          L'activité enzymatique est évaluée par une méthode classique de suivi  
de la réaction de dégradation d'un substrat caractéristique de l'enzyme.

## 2) Conditions de l'essai

15       a) Enzyme

          L'enzyme utilisée est la trypsine, c'est une sérine protéase (comme les  
protéases utilisées dans les détergents). Sa masse est de 23000 g/mol et sa taille est  
comprise entre 20 et 40 Å.

20       Conditionnée sous forme lyophilisée, on la solubilise dans du tampon  
sous forme d'une solution à 4% en masse. C'est cette solution à 4% qui est utilisée  
dans les préparations.

          Pour les mesures, les échantillons témoins sont préparés en prenant  
50µl (50 mg) de cette solution pour 5 g de solution finale soit une teneur en  
enzyme dans la solution finale de 0.04% en masse.

25

b) Vésicules

30       La teneur massique en enzyme dans les vésicules est de 0.15%. Sauf  
indication contraire, les vésicules sont préparées par mélange à température  
ambiante des tensioactifs puis incorporation de la solution aqueuse d'enzyme. On  
obtient ainsi une pâte visqueuse, de texture biréfringente caractéristique  
(observation au microscope optique en lumière polarisée). Cette pâte est dispersée  
par addition lente d'eau sous agitation à température ambiante.

35

          Pour les mesures d'activité, toutes les dispersions de vésicules ont une

teneur de 2% en vésicules. La teneur en enzyme de la dispersion de vésicules est donc de 0,04%.

c) Tampon

5 C'est un tampon phosphate de composition :

NaCl : 8 g/l

KCl : 0.2g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.15 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.2 g/l

10 Le pH est compris entre 7.5 et 8 .

d) Substrat

On utilise comme substrat le N-Benzoyl L arginyl ethyl ester (BAEE) qui est un substrat classiquement utilisé pour étudier l'activité de la trypsine dans la mesure où l'on sait que sa décomposition est catalysée par la trypsine. Le produit de réaction absorbe dans l'UV.

e) Mesure d'activité

Elle est réalisée de la façon suivante :

20

e1. *Destruction des vésicules :*

On prélève 25µl d'échantillon et on ajoute 20 µl de solution de triton X100 (Sigma) à 10%. On laisse agir environ 30 secondes.

25 e2. *Mesure de l'activité enzymatique :*

On prélève 37µl de solution de substrat à 0,024 mol/l, on ajoute 950 µl de tampon et 22,5 µl d'échantillon. On suit la cinétique pendant 10 minutes à une longueur d'onde de 253 nm et à 20°C.

Le vieillissement des échantillons est effectué en étuve, à la température de 37°C.

35 3) Formulation testée

Agents tensioactifs utilisés :

Polysorbate 60 : Polyoxyéthylène (20) sorbitan monostéarate.

5 DODMAB : bromure de diméthyl dioctadécyl ammonium.

Formulation :

- 15% solution aqueuse d'enzyme.
- 35% eau
- 10 • 25% DODMAB.
- 25% Polysorbate 60.

Préparation :

Les tensioactifs et la solution d'enzyme sont mélangés grossièrement à  
15 température ambiante, puis le mélange est introduit dans une cellule de type  
Couette en procédant selon le brevet WO93/19735.

Le cisaillement est réalisé à 25 °C pendant 20 minutes, à un taux  
compris entre 50 et 100 s<sup>-1</sup>.

#### 20 4) Résultats

La dégradation de l'enzyme est suivie par spectroscopie UV.

La figure 3 représente les variations de l'activité enzymatique au cours  
du temps pour l'enzyme encapsulée, en comparaison avec les variations observées  
pour l'enzyme libre. L'activité initiale est fixée arbitrairement à 100 pour le tracé  
25 de la courbe.

La figure 3 met clairement en évidence la stabilisation de l'enzyme du  
fait de son encapsulation.

#### 30 Exemple 6 : Stabilisation d'une enzyme par encapsulation dans une vésicule contenant un esterquat

On procède comme dans l'exemple 5. Le tensioactif utilisé dans cet  
exemple fait partie de la famille des esterquat. Il s'agit du : N,N di(" acyl " oxy-2-  
éthyl), N-hydroxy-2-éthyl, N-méthyl amonium methosulfate en solution dans  
l'isopropanol commercialisé par CECA sous la marque Noxamium 920.

35 Formulation (en pourcentages en poids)

solution aqueuse d'enzyme	15%
eau	35%
Noxamium 920	50%

5

#### Préparation

La préparation des vésicules est analogue à celle de l'exemple 5.

10 La figure 4 représente les variations de l'activité enzymatique au cours du temps pour l'enzyme encapsulée en comparaison avec les variations observées pour l'enzyme libre. L'activité initiale est arbitrairement fixé à 100.

Cette figure met clairement en évidence la stabilisation de l'enzyme du fait de son encapsulation.

## REVENDICATIONS

1. Composition contenant un agent actif encapsulé au sein de vésicules multilamellaires présentant une structure en oignon et constituées, de leur  
5 périphérie jusqu'à leur centre, de membranes concentriques sous forme de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent au moins un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le  
10 liquide interstitiel est de l'eau et en ce que l'agent actif est inclu dans les membranes desdites vésicules lorsqu'il est hydrophobe ou dans le liquide interstitiel lorsqu'il est hydrophile.

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que lesdites vésicules ont des dimensions comprises entre 0,1 et 50  $\mu\text{m}$ , de  
15 préférence entre 0,2 et 10  $\mu\text{m}$ .

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les membranes desdites vésicules comprennent un mélange de deux agents tensioactifs dits respectivement agent tensioactif lipophile, présentant une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 3 et 7, et agent tensioactif hydrophile,  
20 présentant une HLB comprise entre 8 et 15.

5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les membranes des vésicules contiennent au moins un agent tensioactif polymère ou un polymère présentant des propriétés amphiphiles.

6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce  
25 que ledit agent actif est choisi dans le groupe constitué des molécules réductrices, oxydantes, sensibles à l'hydrolyse, en particulier, les vitamines, les enzymes et les protéines.

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit agent actif est un produit sensible à l'oxydation et ledit agent destiné à  
30 éviter sa dégradation, un produit connu pour ses propriétés anti-oxydantes du fait de ses propriétés réductrices ou du fait de son action pour diminuer le risque d'oxydation par effet séquestrant, par exemple par effet séquestrant des traces d'ions métalliques catalyseurs de l'oxydation contenus dans le milieu, ou par action sur le pH du milieu lorsque le potentiel redox dépend du pH.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent de la vitamine C ou un de ses dérivés à titre d'agent actif et au moins un agent destiné à éviter son oxydation.

5 9. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle contient au moins une enzyme à titre d'agent actif dont on cherche à éviter la dégradation et un agent stabilisant destiné à éviter ladite dégradation.

10 10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme est un agent stabilisant connu pour stabiliser les protéines, de préférence un agent agissant sur la conformation de l'enzyme, en particulier un ion, par exemple un ion calcium, ou un agent portant des fonctions susceptibles de se lier à ladite enzyme.

15 11. Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit d'agent destiné à stabiliser ladite enzyme est choisi parmi les agents tensioactifs et les molécules amphiphiles contenant les fonctions suivantes ou substitués par les groupes suivants :

- ammoniums quaternaires,
- amines et éthanolamine,
- molécules portant une fonction phosphate, en particulier phospholipides,
- sels et esters d'acides gras,
- 20 • sels de polyacides,
- alcools,
- glycérol et ses esters (les glycérides),
- polyols, tels que polyglycérides, polyéthylèneglycol, polypropylèneglycol,
- sucres tels que sorbitol, glucose, lactose, saccharose.

25 12. Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que ledit agent destiné à stabiliser ladite enzyme est un polymère, choisi dans le groupe constitué :

- des polysaccharides modifiés ou non, tel que l'agarose, les gommes guar, les carraghénanes, l'acide alginique et les alginates, la pectine, le chitosan,
- 30 - des polyvinylpyrrolidones éventuellement substituées,
- de la cellulose et des dérivés de cellulose tel que les dérivés alkylés ou fonctionnalisés,
- des polyacrylates,
- des polyvinylalcool (PVA) et des dérivés partiellement hydrolysés des
- 35 polyvinylacétates,

- des polyacrylamides,
- des polyamides.

13. Composition selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisée en ce que ledit agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme est un  
5 composant comportant au moins une fonction azotée, en particulier un agent tensioactif ou un polymère.

14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que ledit agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif présente un caractère amphiphile lui conférant un rôle actif dans la formulation des  
10 membranes desdites vésicules.

15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que ledit agent destiné à stabiliser ledit agent actif constitue un second agent actif.

16. Composition selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en  
15 ce que lesdites vésicules comprennent en outre au moins un agent destiné à renforcer leur étanchéité, ledit agent étant encapsulé au sein desdites vésicules ou constituant un enrobage externe desdites vésicules.

17. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- 20 - préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif et incorporant au moins un agent actif et un agent destiné à éviter la dégradation dudit agent actif,
- transformation de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon, par cisaillement.

25 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit cisaillement est un cisaillement homogène.

19. Procédé pour améliorer la stabilité d'un produit actif et éviter sa dégradation, caractérisé en ce qu'il consiste à encapsuler ledit produit actif au sein de vésicules multilamellaires telles que définies dans l'une des revendications 1 à  
30 16 ou obtenues selon le procédé de l'une des revendications 17 ou 18, présentant une structure en oignon et constituées, de leur périphérie jusqu'à leur centre, de membranes sous forme de bicouches concentriques comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites membranes étant séparées par un liquide interstitiel, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la  
35 dégradation dudit produit actif.



20. Procédé pour protéger et/ou immobiliser une enzyme caractérisé en ce qu'il consiste à mettre ladite enzyme en présence de vésicules multilamellaires à structure en oignon incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme tel que défini dans l'une des revendications 10 à 13 ou à encapsuler ladite enzyme au sein de vésicules multilamellaires telles que définies dans l'une des revendications 9 à 13 ou obtenues selon le procédé de l'une des revendications 17 ou 18, lesdites vésicules incorporant en leur sein au moins un agent destiné à éviter la dégradation de ladite enzyme tel que défini dans l'une des revendications 10 à 13.

1/3

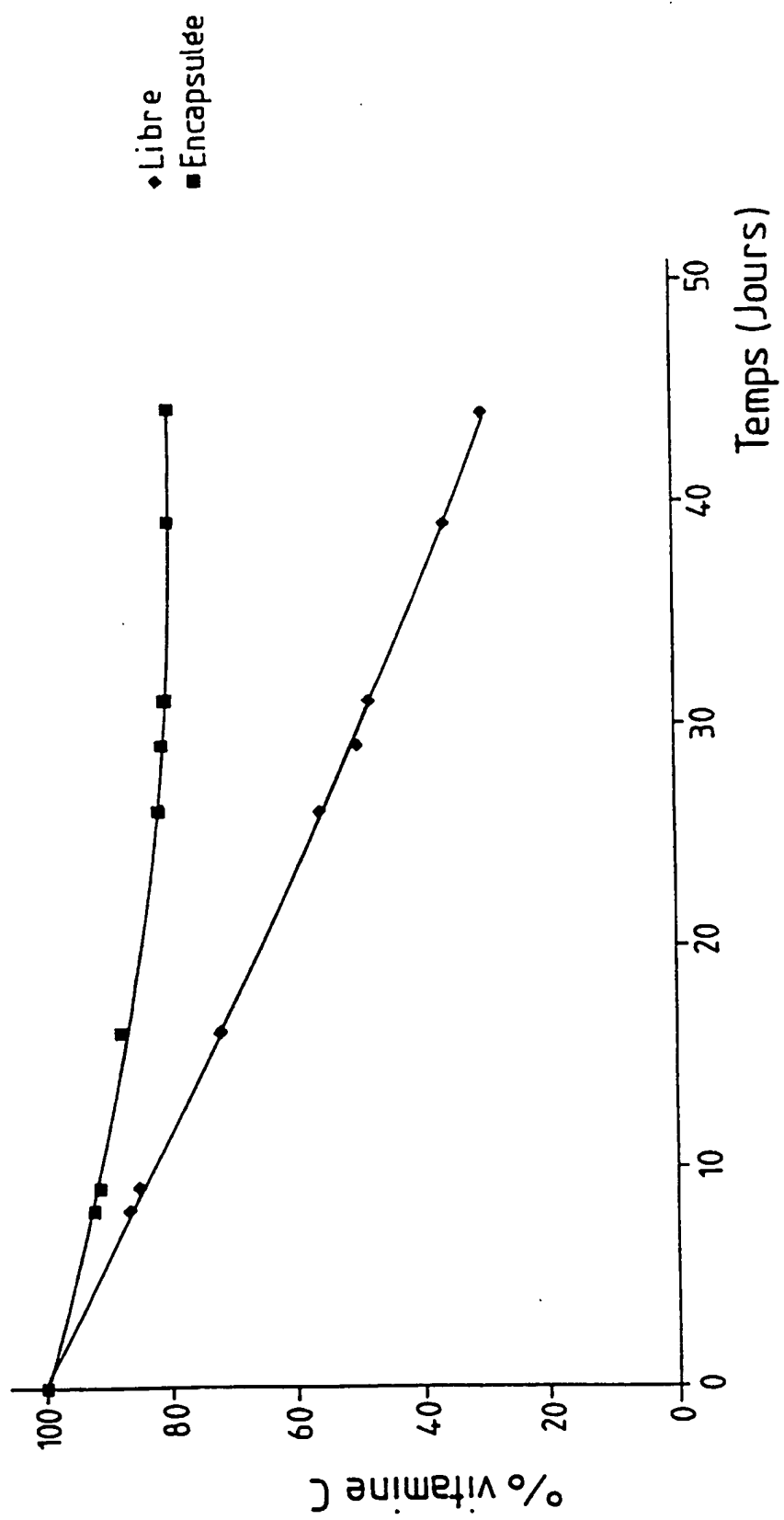


FIG.1

2/3

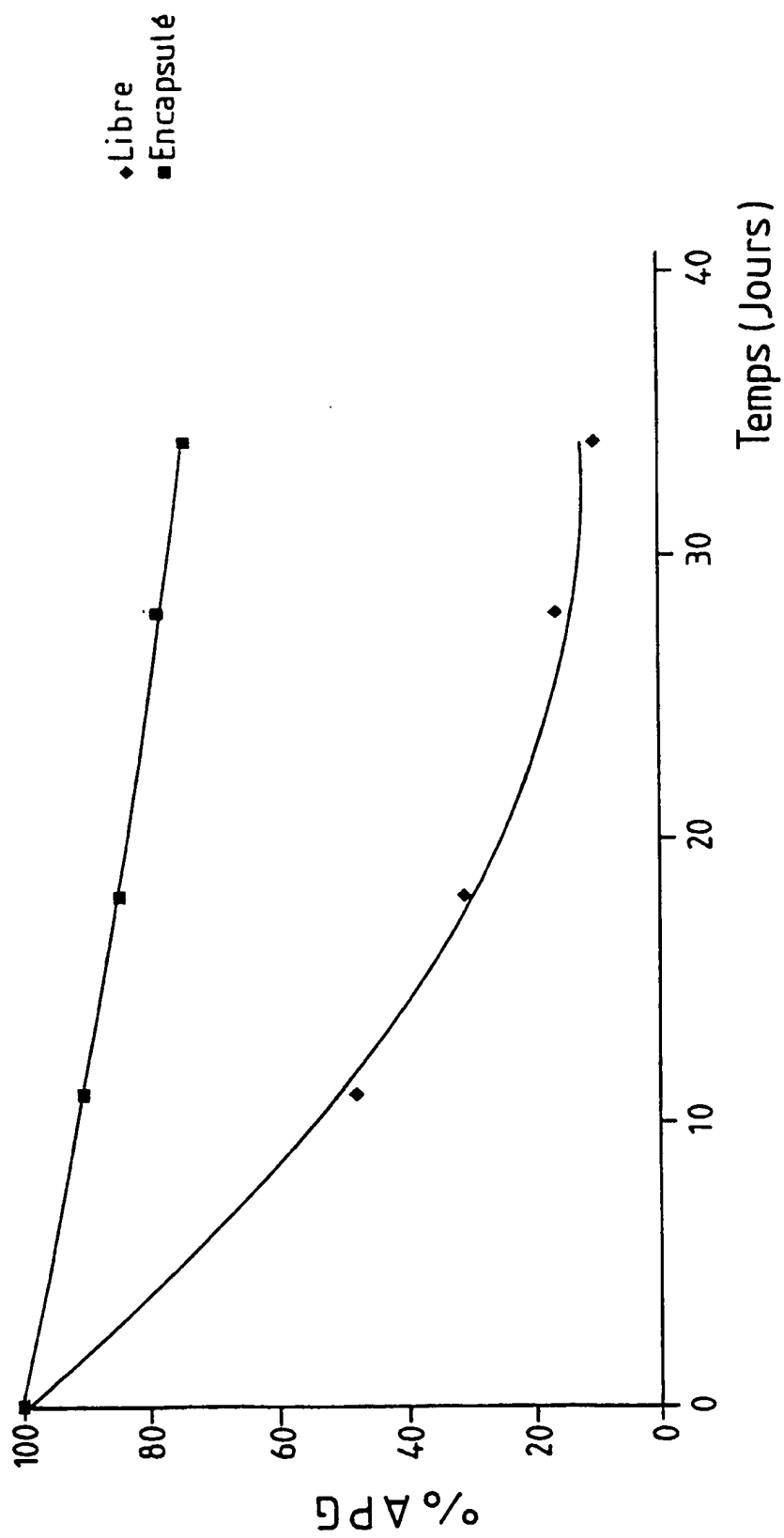


FIG.2

3/3

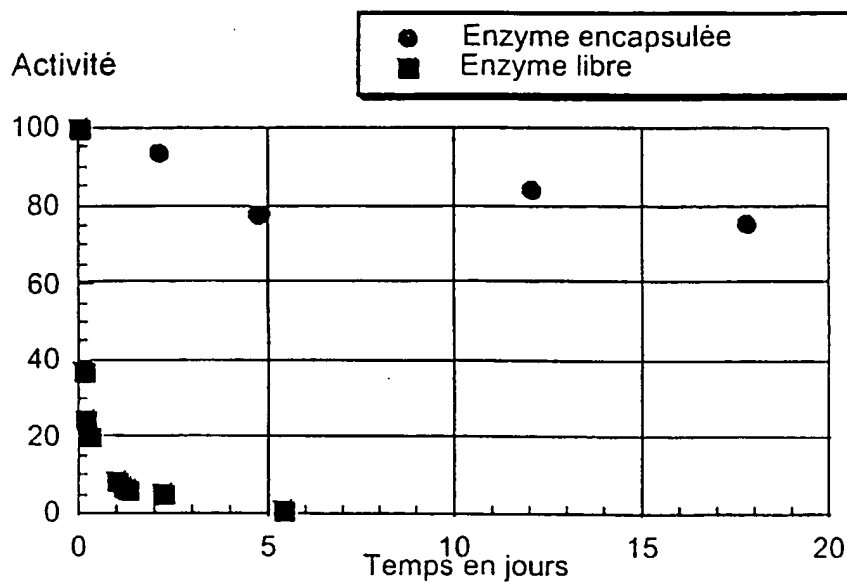


FIG.3

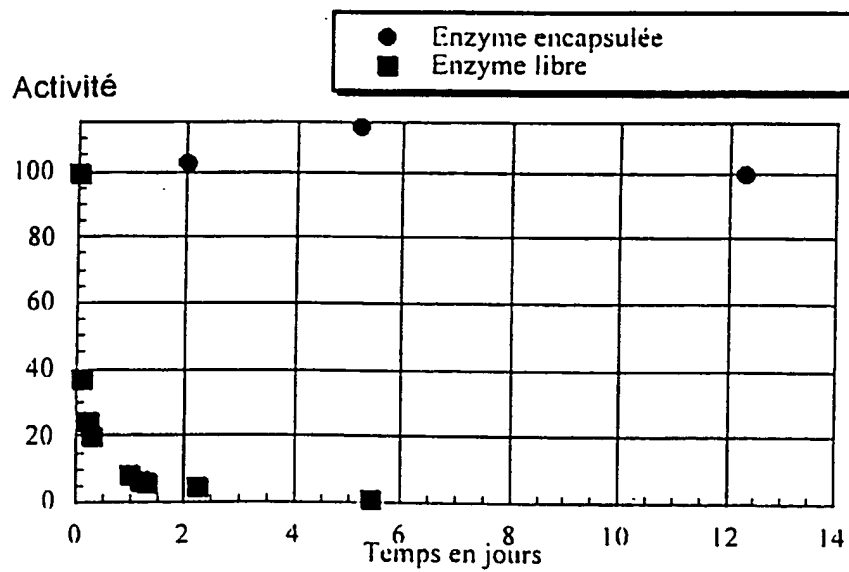


FIG.4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02579

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K9/127 C12N9/96 A61K38/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 31194 A (JOHNSON & JOHNSON CONSUMER ;WANG JONAS C T (US); YUSUF MOHAMMED (U) 10 October 1996 cited in the application see abstract see page 9, line 3-10 see page 10, line 6-18 see page 13, line 16-26 see examples 7,8 ---	1,2,4-7, 14
X	US 5 139 803 A (HAYNES LYNN C ET AL) 18 August 1992 see abstract see column 1, line 11-29 see column 7, line 34-41 see examples 1,2 see column 14, line 4-34 see claims 9,22 ---	1-3,7
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 1999

Date of mailing of the international search report

10/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

La Gaetana, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02579

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 33448 A (SECR DEFENCE ; GREGORIADIS GREGORY (GB); LOUKAS YANNIS (GB)) 14 December 1995 see abstract see page 1, line 22-35 see page 3, line 27 - page 4, line 6 see example 5 see claims 1,5,8,10,11,15 ---	1,2,6,7
X	WO 95 18601 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; ROUX DIDIER (FR); DEGERT CORINNE (FR); LAV) 13 July 1995 cited in the application see page 4, line 10-17 see page 5, line 24 see example 10 ---	1-3,7, 17-19
X	EP 0 688 563 A (GREEN CROSS CORP) 27 December 1995 see page 3, column 1, line 9-15 see page 3, column 1, line 51 - column 2, line 5 see page 1, column 2, line 31-33 see page 4, column 3, line 39-53 see page 4, column 4, line 37-39 see example 3 ---	1-3,9, 10,12
A	US 5 279 834 A (MEYBECK ALAIN) 18 January 1994 see column 2, line 42-51 see examples 1,6,10 ---	1,3,7,15
A	US 4 235 871 A (PAPAHADJOPOULOS DEMETRIOS P ET AL) 25 November 1980 see column 2, line 35-51 see example 1 see claims 1,7,14 ---	1,9
A	FR 2 221 122 A (BAYER AG) 11 October 1974 see page 2, line 24 - page 3, line 1 see example 3 see claims 1,6 ---	1,9
A	FR 2 735 658 A (CAPSULIS) 27 December 1996 cited in the application see abstract see page 1, line 3-20 see page 4, line 33-35 see page 4, line 33-35 see page 5, line 12-18 see page 6, line 13-21 see page 9, line 28 - page 10, line 9 see claims 1,9,10 ---	1-8, 16-19
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02579

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 93 19735 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;ROUX DIDIER (FR); DIAT OLIVIER (FR); LAVER) 14 October 1993 cited in the application see the whole document -----</p>	1,17-19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02579

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see supplementary sheet CONTINUATION OF INFORMATION PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02579

Owing to the very large number of molecules defined by the expression "enzyme" in Claims 9-13, the search had to be restricted for economic reasons. The search more particularly focused on the expression "enzyme", the enzymes present in examples 5 and 6, and in the classes IPC A61K38/43 up to A61K38/58 and C12N9/96.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02579

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9631194	A	10-10-1996	AU 5532296 A	23-10-1996
			BR 9604954 A	09-06-1998
			CA 2217201 A	10-10-1996
			CN 1185729 A	24-06-1998
			CZ 9703119 A	14-01-1998
			EP 0818988 A	21-01-1998
			PL 322624 A	02-02-1998
US 5139803	A	18-08-1992	US 5015483 A	14-05-1991
WO 9533448	A	14-12-1995	AU 695773 B	20-08-1998
			AU 2622695 A	04-01-1996
			CA 2191863 A	14-12-1995
			EP 0762871 A	19-03-1997
			GB 2302505 A,B	22-01-1997
			ZA 9504577 A	26-01-1996
WO 9518601	A	13-07-1995	FR 2714621 A	07-07-1995
			CA 2180480 A	13-07-1995
			EP 0737063 A	16-10-1996
			JP 9507165 T	22-07-1997
EP 0688563	A	27-12-1995	JP 6247842 A	06-09-1994
			US 5662931 A	02-09-1997
			CA 2155958 A	01-09-1994
			WO 9418948 A	01-09-1994
US 5279834	A	18-01-1994	FR 2616325 A	16-12-1988
			AT 62594 T	15-05-1991
			EP 0300842 A	25-01-1989
			WO 8809659 A	15-12-1988
			JP 2845466 B	13-01-1999
			JP 3501842 T	25-04-1991
US 4235871	A	25-11-1980	BE 874408 A	23-08-1979
			DE 2907303 A	06-09-1979
			EP 0004223 A	19-09-1979
			FR 2418023 A	21-09-1979
			GB 2015464 A,B	12-09-1979
			US 4394448 A	19-07-1983
			US 4394149 A	19-07-1983
FR 2221122	A	11-10-1974	AU 5310773 A	12-09-1974
			BE 796610 A	12-09-1973
			DE 2249552 A	30-05-1973
			JP 49118826 A	13-11-1974
			NL 7304133 A	25-09-1974
FR 2735658	A	27-12-1996	AU 6363196 A	22-01-1997
			CA 2225797 A	09-01-1997
			EP 0833573 A	08-04-1998
			WO 9700623 A	09-01-1997
WO 9319735	A	14-10-1993	FR 2689418 A	08-10-1993
			CA 2133421 A	14-10-1993
			DE 69300823 D	21-12-1995
			DE 69300823 T	01-08-1996
			EP 0633768 A	18-01-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02579

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9319735 A		ES 2082643 T	16-03-1996
		JP 7505330 T	15-06-1995
		US 5792472 A	11-08-1998
<hr/>			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 98/02579

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K9/127 C12N9/96 A61K38/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 31194 A (JOHNSON & JOHNSON CONSUMER ;WANG JONAS C T (US); YUSUF MOHAMMED (U) 10 octobre 1996 cité dans la demande voir abrégé voir page 9, ligne 3-10 voir page 10, ligne 6-18 voir page 13, ligne 16-26 voir exemples 7,8	1,2,4-7, 14
X	US 5 139 803 A (HAYNES LYNN C ET AL) 18 août 1992 voir abrégé voir colonne 1, ligne 11-29 voir colonne 7, ligne 34-41 voir exemples 1,2 voir colonne 14, ligne 4-34 voir revendications 9,22	1-3,7

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/03/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

La Gaetana, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 98/02579

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 33448 A (SECR DEFENCE ;GREGORIADIS GREGORY (GB); LOUKAS YANNIS (GB)) 14 décembre 1995 voir abrégé voir page 1, ligne 22-35 voir page 3, ligne 27 - page 4, ligne 6 voir exemple 5 voir revendications 1,5,8,10,11,15 ---	1,2,6,7
X	WO 95 18601 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;ROUX DIDIER (FR); DEGERT CORINNE (FR); LAV) 13 juillet 1995 cité dans la demande voir page 4, ligne 10-17 voir page 5, ligne 24 voir exemple 10 ---	1-3,7, 17-19
X	EP 0 688 563 A (GREEN CROSS CORP) 27 décembre 1995 voir page 3, colonne 1, ligne 9-15 voir page 3, colonne 1, ligne 51 - colonne 2, ligne 5 voir page 1, colonne 2, ligne 31-33 voir page 4, colonne 3, ligne 39-53 voir page 4, colonne 4, ligne 37-39 voir exemple 3 ---	1-3,9, 10,12
A	US 5 279 834 A (MEYBECK ALAIN) 18 janvier 1994 voir colonne 2, ligne 42-51 voir exemples 1,6,10 ---	1,3,7,15
A	US 4 235 871 A (PAPAHADJOPOULOS DEMETRIOS P ET AL) 25 novembre 1980 voir colonne 2, ligne 35-51 voir exemple 1 voir revendications 1,7,14 ---	1,9
A	FR 2 221 122 A (BAYER AG) 11 octobre 1974 voir page 2, ligne 24 - page 3, ligne 1 voir exemple 3 voir revendications 1,6 ---	1,9
A	FR 2 735 658 A (CAPSULIS) 27 décembre 1996 cité dans la demande voir abrégé voir page 1, ligne 3-20 voir page 4, ligne 33-35 voir page 4, ligne 33-35 voir page 5, ligne 12-18 voir page 6, ligne 13-21 voir page 9, ligne 28 - page 10, ligne 9 voir revendications 1,9,10 ---	1-8, 16-19
	---	

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 98/02579

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités. avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 93 19735 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; ROUX DIDIER (FR); DIAT OLIVIER (FR); LAVER) 14 octobre 1993 cité dans la demande voir le document en entier -----</p>	1,17-19

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

La demande internationale n°

PCT/FR 98/02579

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°s  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
**voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210**
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

**Remarque quant à la réserve**

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

En raison du très grand nombre de molécules définis par le terme "enzyme" dans les revendications 9-13, la recherche a du être limitée pour des raisons économiques. La recherche a porté plus particulièrement sur le terme "enzyme", les enzymes présents dans les exemples 5 et 6, et dans les classes IPC A61K38/43 jusqu'à A61K38/58 et C12N9/96.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 98/02579

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9631194 A	10-10-1996	AU 5532296 A BR 9604954 A CA 2217201 A CN 1185729 A CZ 9703119 A EP 0818988 A PL 322624 A	23-10-1996 09-06-1998 10-10-1996 24-06-1998 14-01-1998 21-01-1998 02-02-1998
US 5139803 A	18-08-1992	US 5015483 A	14-05-1991
WO 9533448 A	14-12-1995	AU 695773 B AU 2622695 A CA 2191863 A EP 0762871 A GB 2302505 A,B ZA 9504577 A	20-08-1998 04-01-1996 14-12-1995 19-03-1997 22-01-1997 26-01-1996
WO 9518601 A	13-07-1995	FR 2714621 A CA 2180480 A EP 0737063 A JP 9507165 T	07-07-1995 13-07-1995 16-10-1996 22-07-1997
EP 0688563 A	27-12-1995	JP 6247842 A US 5662931 A CA 2155958 A WO 9418948 A	06-09-1994 02-09-1997 01-09-1994 01-09-1994
US 5279834 A	18-01-1994	FR 2616325 A AT 62594 T EP 0300842 A WO 8809659 A JP 2845466 B JP 3501842 T	16-12-1988 15-05-1991 25-01-1989 15-12-1988 13-01-1999 25-04-1991
US 4235871 A	25-11-1980	BE 874408 A DE 2907303 A EP 0004223 A FR 2418023 A GB 2015464 A,B US 4394448 A US 4394149 A	23-08-1979 06-09-1979 19-09-1979 21-09-1979 12-09-1979 19-07-1983 19-07-1983
FR 2221122 A	11-10-1974	AU 5310773 A BE 796610 A DE 2249552 A JP 49118826 A NL 7304133 A	12-09-1974 12-09-1973 30-05-1973 13-11-1974 25-09-1974
FR 2735658 A	27-12-1996	AU 6363196 A CA 2225797 A EP 0833573 A WO 9700623 A	22-01-1997 09-01-1997 08-04-1998 09-01-1997
WO 9319735 A	14-10-1993	FR 2689418 A CA 2133421 A DE 69300823 D DE 69300823 T EP 0633768 A	08-10-1993 14-10-1993 21-12-1995 01-08-1996 18-01-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 98/02579

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9319735 A		ES 2082643 T	16-03-1996
		JP 7505330 T	15-06-1995
		US 5792472 A	11-08-1998
<hr/>			